CE IVD
Fabriqué en Allemagne

25°
18°

R 36/37/38-42,
S 22-24-26-37/39

Kit d'extraction d'ADN oCheck®

Notice d'utilisation

Préparation en colonne unitaire (réf. 515 040)
Préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050)

Pour usage diagnostic in-vitro par le personnel de laboratoire qualifié exclusivement

Révision 00 / Février 2011

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Allemagne
Téléphone : +49 (0) 7022 948-0 • Télécopie +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

EXPLICATION DES SYMBOLES

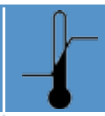
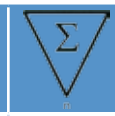
											
en	Do not reuse	Use by	Consult Instructions for Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Nicht wiederverwenden	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-vitro-Diagnostikum	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	Ne pas réutiliser	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	N° de lot	Note importante
es	No utilizar más	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	irritante	Código de lote	Nota importante
it	Non riutilizzabile	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Não utilzar mais	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Niet opnieuw gebruiken	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Må ikke genbruges	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Får ej återanvändas	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Nie stosować ponownie	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Må ikke brukes flere ganger	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Προϊόν μίας χρήσης	Χρήση έως	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες χρήσης	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	In Vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή	Περιορισμοί θερμοκρασίας	περιέχει επαρκές υλικό για < n > δοκιμασίες	Ερεθιστικό	Κωδικός παρτίδας	Σημαντική σημείωση
tr	Yeniden ullanmayın	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

TABLE DES MATIÈRES

1. COMPOSITION DU KIT 5
2. CONSOMMABLES ET ÉQUIPEMENT REQUIS 6
   - 2.1 Préparation en colonne unitaire (réf. 515 040) 6
   - 2.2 Préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050) 7
3. EXPÉDITION ET STOCKAGE 8
4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ 8
5. ÉLIMINATION DES DÉCHETS 9
6. INTRODUCTION 10
   - 6.1 Destination 10
   - 6.2 Utilisation incorrecte 10
   - 6.3 Matériel de prélèvement 11
   - 6.4 Principe de base de la purification de l'ADN 11
7. CONDITIONS GENERALES DE TRAVAIL AVEC oCheck® 12
   - 7.1 Instructions générales 12
   - 7.2 Séparation des salles 12
   - 7.3 Avertissements et précautions 13
     - 7.3.1 Prévention de la contamination 13
     - 7.3.2 Précautions générales 13
     - 7.3.3 Travailler en toute sécurité 14
8. PRÉPARATION EN COLONNE UNITAIRE (réf. 515 040) 15
   - 8.1 Préparation des solutions de travail et conditions de conservation 15
   - 8.2 Préparation des échantillons 16
     - 8.2.1 Préparation des échantillons pour Papill**oCheck**® et Papill**oCheck**® high-risk 16
     - 8.2.2 Préparation des échantillons pour Pelv**oCheck**® CT/NG 16
   - 8.3 Protocole standard 17
     - 8.3.1 Préparation 17
     - 8.3.2 Pré-lyse 17
     - 8.3.3 Lyse 17
     - 8.3.4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN 17
     - 8.3.5 Fixation de l'ADN 18
     - 8.3.6 Lavage des colonnes 18
     - 8.3.7 Séchage des colonnes 18
     - 8.3.8 Élution de l'ADN 19

9. GUIDE D'INSTALLATION ET DE TRAVAIL POUR oCheck® VAC SET ET oCheck® VAC PUMP 20
9.1 Contenu 20
9.1.1 oCheck® VacSet 20
9.1.2 oCheck® VacPump 21
9.2 Montage du oCheck® VacSet 22
9.2.1 Installation pour la fixation et le lavage de l'ADN 22
9.2.2 Installation pour l'élution de l'ADN 23
9.3 Montage du oCheck® VacPump 24
9.4 Etablissement du vide 24
9.5 Application du vide 24
9.6 Arrêt du vide 24
10. PRÉPARATION EN BARRETTES DE 8 COLONNES (réf. 515 050) 25
10.1 Préparation des solutions de travail et conditions de conservation 25
10.2 Préparation des échantillons 26
10.2.1 Préparation des échantillons pour Papill**oCheck**® et Papill**oCheck**® high-risk 26
10.3 Protocole standard 27
10.3.1 Préparation 27
10.3.2 Pré-lyse 27
10.3.3 Lyse 27
10.3.4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN 27
10.3.5 Fixation de l'ADN 28
10.3.6 Lavage des barrettes de colonnes 30
10.3.7 Séchage des barrettes de colonnes 31
10.3.8 Élution de l'ADN 31
11. DÉPANNAGE 33
12. ASSISTANCE TECHNIQUE 34
13. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE 34
14. PROTOCOLES RÉSUMÉS 35
14.1 Protocole résumé pour préparation en colonne unitaire (réf. 515 040) 35
14.2 Protocole résumé pour préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050) 37

1. COMPOSITION DU KIT

Kit d'extraction d'ADN oCheck®	Nom	Préparation en colonne unitaire (réf. 515 040)	Préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050)
BUF L1	Tampon L1	20 ml	20 ml
BUF L2	Tampon L2	12 ml	24 ml
REAG L3	Réactif L3	3 ml	6 ml
BUF W1	Tampon W1	30 ml	75 ml
BUF W2	Tampon W2 (concentré)	14 ml	50 ml
BUF E	Tampon E	15 ml	50 ml
Proteinase K	Protéinase K (lyophilisée)	30 mg	75 mg
Proteinase BUF PKB	Tampon de protéinase PKB	1,8 ml	3,6 ml
Carrier RNA	ARN porteur (lyophilisé)	0,3 mg	0,3 mg
Spin Columns	Colonnes	50	-
Collection Tubes	Tubes collecteurs	250	-
Binding Strips	Barrettes de colonnes	-	12
Paper Sheet	Feuille de papier	-	10
BUF L4	Étiquette pour tampon L4	1	1
	Instructions de téléchargement du mode d'emploi	1	1

2. CONSOMMABLES ET ÉQUIPEMENT REQUIS

2.1 Préparation avec une colonne unitaire (réf. 515 040)

Consommables	Réf. Greiner Bio-One	Quantité (unités)
Kit d'extraction d'ADN oCheck® – Préparation en colonne unitaire	515 040	50 préparations
Pointes à filtre stériles exempt DNase pour micropipettes		
Pointes à filtre de 0,5 à 10 µl	765 288	96
Pointes à filtre de 0,5 à 20 µl	774 288	96
Pointes à filtre de 10 à 100 µl	772 288	96
Pointes à filtre de 10 à 200 µl	739 288	96
Pointes à filtre de 100 à 1000 µl	750 288	60

Consommables supplémentaires requis

- Microtubes de 1,5 ou 2,0 ml avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse
- Éthanol p.a. ≥ 99,8 %
- Gants à usage unique

Équipement supplémentaire requis

- Microcentrifugeuse adaptée pour des microtubes de 1,5 ou 2,0 ml et 11 000 g
- Vortex
- Bloc chauffant, bain-marie ou thermomixer pouvant recevoir des microtubes de 1,5 ou 2,0 ml pour une incubation à 70 °C et 56 °C
- Micropipettes variant de 1 à 1000 µl
- Récipient à déchets
- Minuteur

2.2 Préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050)

Consommables	Réf. Greiner Bio-One	Quantité (unités)
Kit d'extraction d'ADN oCheck® – Préparation en barrette de 8 colonnes	515 050	12 x 8 préparations
Pointes à filtre stériles exempt DNase pour micropipettes		
Pointes à filtre de 0,5 à 10 µl	765 288	96
Pointes à filtre de 0,5 à 20 µl	774 288	96
Pointes à filtre de 10 à 100 µl	772 288	96
Pointes à filtre de 10 à 200 µl	739 288	96
Pointes à filtre de 100 à 1000 µl	750 288	60
Barrettes de 8 tubes sans bouchon pour PCR	673 210	125
Barrettes de bouchons pour barrettes de 8 tubes	373 270	125
Tubes individuels PCR	671 201	500

Équipement	Réf. Greiner Bio-One	Quantité (unités)
oCheck® VacSet	863 080	1
oCheck® VacPump	863 070	1

Consommables supplémentaires requis

- Microtubes de 1,5 ou 2,0 ml avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse
- Réservoir pour réactifs (jetables), volumes : 25 et 100 ml
- Pointes à filtre (capacité de 1200 µl en volume) pour pipette 8 canaux
- Éthanol p.a. ≥ 99,8 %
- Gants à usage unique

Équipement supplémentaire requis

- Microcentrifugeuse adaptée pour des microtubes de 1,5 ou 2,0 ml et 11 000 g
- Vortex
- Bloc chauffant, bain-marie ou thermomixer pouvant recevoir des tubes de réaction de 1,5 ou 2,0 ml pour une incubation à 70 °C et 56 °C
- Micropipettes variant de 1 à 1000 µl
- Multipipette 8 canaux pour volumes de 50 à 1200 µl
- Récipient à déchets
- Minuteur
- Rack pour microtubes PCR

3. EXPÉDITION ET STOCKAGE

Le stockage et l'expédition du kit d'extraction d'ADN oCheck® ont lieu à température ambiante. Pour le stockage des solutions de travail préparées, consulter les sections 8.1 et 10.1.

4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ

Les composants suivants du kit d'extraction d'ADN oCheck® contiennent des substances dangereuses.

Porter des gants et des lunettes de protection et respecter les consignes de sécurité mentionnées dans le présent chapitre.

Composant	Substance dangereuse	Symbole de danger	Phrases de risque	Phrases de risque	Phrases de sécurité
Tampon L2	Chlorhydrate de guanidine	*	Nocif en cas d'ingestion, irritant pour les yeux et la peau	R 22-36/38	
Tampon W1	Chlorhydrate de guanidine + alcool isopropylique < 25 %	*	Inflammable, nocif en cas d'ingestion, irritant pour les yeux et la peau	R 10-22-36/38	S7-16-25
Protéinase K	Protéinase K, lyophilisée	*	Irritante pour les yeux, le système respiratoire et la peau, peut causer une sensibilisation en cas d'inhalation	R 36/37/38-42	S 22-24-26-36/37

* Informations relatives aux risques non nécessaires si la quantité par bouteille est inférieure à 125 g ou ml (conformément aux directives 67/548/CEE, article 25 et 1999/45/CE, article 12, et à la législation allemande relative aux substances dangereuses GefStoffV § 20 (3) et TRGS 200 7.1). Pour de plus amples informations, consulter la Fiche de données de sécurité.

Phrases de risque

R10	Inflammable
R22	Nocif en cas d'ingestion
R 36/37/38	Irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau
R 36/38	Irritant pour les yeux et la peau
R 42	Peut causer une sensibilisation en cas d'inhalation

Phrases de sécurité

S7	Maintenir le contenant hermétiquement fermé
S16	Garder à l'écart des sources d'ignition - Ne pas fumer
S 22	Ne pas inhaler la poussière
S 24	Éviter tout contact avec la peau
S 25	Éviter tout contact avec les yeux
S 26	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin
S 36/37	Porter des vêtements et des gants de protection appropriés

La version actuelle de la Fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée depuis le site Web de Greiner Bio-One : **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Le chlorhydrate de guanidine contenu dans les tampons L2 et W1 peut former des composés hautement réactifs s'il est mélangé à de la Javel. Ne pas ajouter directement de Javel ni de solutions acides aux déchets de préparation des échantillons.

La contamination des déchets liquides par un matériel infectieux résiduel est hautement improbable mais ne peut être totalement exclue. Dès lors, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et manipulés et éliminés conformément aux règlements de sécurité locaux. Respecter scrupuleusement les directives fédérales, nationales et locales relatives à l'élimination des déchets.

6. INTRODUCTION

6.1 Destination

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® (Greiner Bio-One ; réf. 515 040 ou 515 050) est un kit de diagnostic in vitro destiné à préparer l'ADN d'échantillons humains avant analyse à l'aide des systèmes d'essai de la gamme de produits oCheck®.

La méthode utilisée pour isoler l'acide nucléique à partir du kit d'extraction d'ADN oCheck® produit un ADN adapté à l'analyse directe. Le Kit d'extraction d'ADN oCheck® est disponible en plusieurs versions:

Kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation avec une colonne unitaire (réf. 515 040)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One ; réf. 505 060)
- Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One ; réf. 504 002)

Kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation en barrette de 8 colonnes (réf. 515 050)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One ; réf. 505 060)

L'utilisation du kit d'extraction d'ADN oCheck® - en barrettes de 8 colonnes pour isoler de l'ADN en vue d'une analyse par le système d'essai Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One ; réf. 504 002) n'est pas recommandée.

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® est destiné à être utilisé exclusivement en association avec les réactifs de la gamme de produits oCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne).

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® respecte les exigences de la directive relative au diagnostic in vitro (98/79/CE), et dispose dès lors du marquage de conformité CE.
Le produit est EXCLUSIVEMENT destiné à être utilisé par des professionnels, tels que des techniciens et des médecins, formés en techniques de biologie moléculaire.

6.2 Utilisation incorrecte

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® n'est **PAS** destiné à être utilisé avec Carn**oCheck**® (Greiner Bio-One), Par**oCheck**® (Greiner-Bio-One) ni avec tout autre produit qui ne fait pas partie de la gamme de produits oCheck®.

6.3 Matériel de prélèvement

Pour l'utilisation en aval de Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 060) et Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One ; réf. 505 060), le kit d'extraction d'ADN oCheck® a été conçu et testé pour extraire de **l'ADN génomique humain et de l'ADN viral** depuis des **frottis du col de l'utérus humains** recueillis à l'aide de l'un des systèmes de prélèvement d'échantillon suivants :

- Kit de prélèvement Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 070)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, États-Unis)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Pour l'utilisation de Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One ; réf. 504 002), le kit d'extraction d'ADN oCheck® a été validé pour l'extraction de **l'ADN génomique humain et de l'ADN bactérien** depuis des **échantillons d'urine humaine** recueillis à l'aide des systèmes de prélèvement suivants :

- Kit de prélèvement Pelv**oCheck**® SAFE (Greiner Bio-One ; réf. 453 100)
- Kit de prélèvement Pelv**oCheck**® STRAW (Greiner Bio-One ; réf. 453 101)

Les autres systèmes de prélèvement n'ont pas été validés et ne doivent pas être utilisés avec le kit d'extraction d'ADN oCheck®.

6.4 Principe de base de la purification de l'ADN

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® est conçu pour la purification d'ADN génomique humain, viral et bactérien à partir d'échantillons d'origine humaine. Le matériel prélevé est rapidement et efficacement lysé par l'ajout de protéinase K et de tampon L1. Le tampon de lyse et l'éthanol créent des conditions appropriées pour la fixation d'acides nucléiques à la membrane de silice des colonnes. L'ARN porteur améliore la fixation et la récupération d'ADN viral, bactérien et génomique humain faiblement concentré. Les contaminants (inhibiteurs potentiels de la PCR), tels que les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires solubles, sont éliminés au cours des étapes de lavage avec des tampons de lavage à base d'éthanol. Enfin, l'ADN génomique humain, viral ou bactérien est élué dans des conditions de faible force ionique, dans un tampon d'élution légèrement alcalin. Après purification, l'ADN se trouve dans une solution appropriée pour une analyse directe par les systèmes d'essai de la gamme de produits oCheck®.

7. CONDITIONS GÉNÉRALS DE TRAVAIL AVEC oCheck®

7.1 Instructions générales

Les instructions suivantes sont établies pour des expériences réalisées en laboratoire mettant en œuvre les techniques de pointe actuellement utilisées en biologie moléculaire, et elles visent à garantir une sécurité maximale pour les méthodes à base de PCR. Des précautions raisonnables doivent être prises lors de l'utilisation du kit d'extraction d'ADN oCheck® en association avec une analyse de la gamme de produits oCheck®.

En général, les processus de biologie moléculaire, tels que l'extraction, l'amplification et la détection d'ADN, requièrent du personnel dûment qualifié. En outre, un déroulement des travaux net et bien structuré est nécessaire pour éviter des résultats erronés dus à une dégradation ou à une contamination par des produits d'amplification de l'acide nucléique dans les échantillons. À cet effet, il est nécessaire de séparer les zones d'extraction, d'amplification et de révèlations.

Ne jamais introduire des produits d'amplification dans la zone qui a été désignée pour l'extraction. Les deux zones doivent être munies d'un équipement, de consommables, de blouses et de gants séparés. Ne jamais transférer les blouses, les gants ou l'équipement de la zone prévue pour l'extraction jusqu'à la zone prévue pour l'amplification.

7.2 Séparation des salles

La figure 1 illustre la façon dont un laboratoire peut être séparé en trois sections distinctes. L'une des salles est utilisée pour l'extraction d'ADN uniquement, la deuxième pour la mise en place et la réalisation des réactions de PCR et la troisième pour l'hybridation et l'analyse. Afin d'éviter la contamination des échantillons, chaque salle doit être exclusivement réservée à l'application ou à la technique indiquée. L'utilisation de couleurs peut être avantageuse pour éviter un échange accidentel d'équipement ou de consommables entre les zones.

! Ni l'équipement ni les consommables ne doivent être interchangés entre les différentes salles et les différents espaces du laboratoire. Ainsi, une duplication de l'équipement et des consommables est nécessaire et doit être prise en compte.

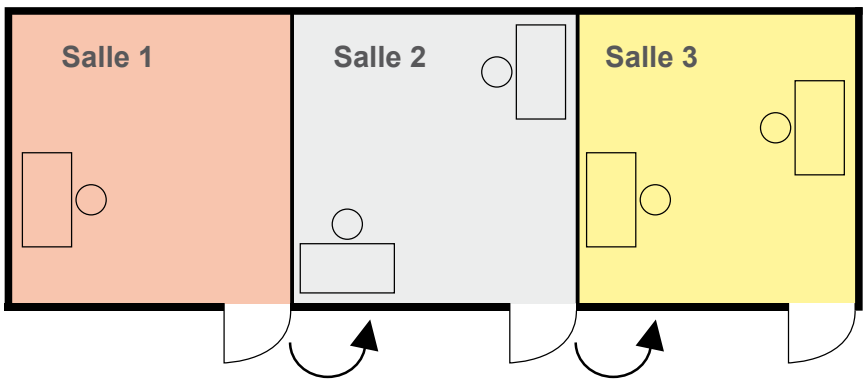


Figure 1 : Séparation des salles pour le déroulement des travaux avec oCheck®
Salle 1 : extraction d'ADN, Salle 2 : mise en place de la réaction de PCR et division du mélange réactionnel sur une paillasse propre ; zone spécifique pour l'ajout de la matrice d'ADN ; Salle 3 : hybridation et analyse

Toute la procédure d'extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® doit être réalisée dans la salle 1, salle d'extraction d'ADN. Après avoir quitté cette salle, il faut changer de blouse. Dans le déroulement des travaux avec oCheck® , l'extraction d'ADN est le processus le plus sensible à la contamination ; il est donc essentiel de respecter strictement les instructions contenues dans le présent document. En outre, les directives relatives à la prévention de la contamination qui sont définies dans la section 7.3.1 doivent être respectées.

Dans la salle 2, le mélange réactionnel pour la PCR est installé et reparti sur une paillasse propre. L'ajout de l'ADN extrait dans la salle 1 doit être réalisé dans un espace à part de la salle 2. Après avoir quitté cette salle, il faut changer de blouse.

Les étapes de réaction d'hybridation et de lavage ont lieu dans la troisième salle du laboratoire. En outre, dans la salle 3, le CheckScanner™ connecté avec le logiciel CheckReport™ est installé pour l'analyse finale du test oCheck®.

7.3 Avertissements et précautions

7.3.1 Prévention de la contamination

- **Il faut porter une blouse** tout au long des procédures, et chaque salle du laboratoire doit disposer de plusieurs jeux de blouses.
- **Il faut porter des gants** à chaque étape de l'analyse, et il faut en changer pour chaque étape différente.
- **Propreté du laboratoire :** le plan de travail doit être décontaminé avant et après le travail à l'aide d'une solution de nettoyage appropriée.
- **Tubes de réaction :** ne jamais toucher l'intérieur du bouchon du tube de réaction. Pour éviter une contamination croisée, n'ouvrir qu'un seul tube à la fois. Pour éviter toute contamination, utiliser des tubes de réaction avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse.
- Utiliser des pointes à **filtre pour micropipettes** appropriées (stériles, sans ADNase, sans ARNase et sans ADN humain). Toujours changer les pointes des pipettes entre les transferts de liquides.

7.3.2 Précautions générales

- Lors de sa livraison, vérifier que le kit d'extraction d'ADN oCheck® n'est pas endommagé. Si l'un des composants (par exemple, les flacons de tampon) est endommagé, contacter Greiner Bio-One ou son distributeur. Ne pas utiliser des composants de kit endommagés, faute de quoi les performances du kit pourraient être réduites.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés.
- Ne pas utiliser le kit d'extraction d'ADN oCheck® après la date de péremption.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Utiliser uniquement les réactifs/l'équipement prévus avec le kit et ceux recommandés par le fabricant.
- Il est nécessaire de régulièrement calibrer/vérifier les pipettes, le bain-marie et le bloc chauffant.
- Le pipetage de petites quantités de l'ordre du microlitre est une opération délicate. Il faut dès lors veiller à pipeter à l'aide des micropipettes avec la plus grande précision possible.
- Toutes les étapes de centrifugation doivent être réalisées à **température ambiante (de 18 à 25 °C).**
- Les réactifs inutilisés et les déchets doivent être éliminés conformément aux directives fédérales et nationales.

7.3.3 Travailler en toute sécurité

- Le présent kit est uniquement destiné à être utilisé à des fins de diagnostic in vitro et ne doit être employé que par du personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.
- Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ni appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.
- Faire preuve de prudence lors de la manipulation d'échantillons biologiques contenant du matériel humain potentiellement infectieux. Afin de réduire le risque d'infection lié à du matériel potentiellement infectieux, il est recommandé de travailler sous flux laminaire jusqu'à ce que les échantillons aient été lysés. Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques, ainsi que toute projections.
- Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.
- Toujours porter une blouse, des gants et des lunettes de protection dans le cadre d'un travail avec des échantillons humains. La version actuelle de la Fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée depuis le site Web de Greiner Bio-One : **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

8. PRÉPARATION EN COLONNE UNITAIRE (réf. 515 040)

8.1 Préparation des solutions et conditions de conservation

Tous les composants du kit doivent être conservés à **température ambiante (de 18 à 25 °C).** Ils restent stables pendant **deux ans** à compter de la date de fabrication.

Avant d'initier à suivre le protocole du kit d'extraction d'ADN oCheck® , préparer les solutions suivantes :

1. Solution de **protéinase K** : avant d'utiliser le kit pour la première fois, ajouter **1,35 ml de tampon de protéinase (PKB)** pour dissoudre la **protéinase K lyophilisée.** Repartir la solution en aliquots et conserver à -20 °C pendant une durée maximale de 6 mois. Ne pas recongeler.

2. **Tampon W2 :** ajouter **56 ml** d'**éthanol** (p.a. ≥ 99,8 %) au concentré de **tampon W2.** Écrire la date sur l'étiquette du flacon. **Le tampon W2** reste stable à **température ambiante (de 18 à 25 °C)** pendant une durée maximale d'un an.

3. **Tampon L4 :** transférer l'intégralité du **tampon L2** dans le **réactif L3** et bien mélanger. Étiqueter le flacon à l'aide de l'étiquette **L4** fournie dans le kit. Écrire la date sur l'étiquette du flacon. Le **tampon L4** produit reste stable pendant une période allant jusqu'à un an à **température ambiante (de 18 à 25 °C)**.

4. Solution d'**ARN porteur :** ajouter **900 µl de tampon L1** pour dissoudre **l'ADN porteur** lyophilisé. Distribuer l'**ARN porteur** dissous en aliquots, par exemple en aliquots de **35 µl** pour 12 extractions. Conserver la **solution d'ARN porteur dissoute** à **-20 °C**. Ne pas recongeler ! Les flacons utilisés doivent être éliminés une fois décongelés.

Pendant le stockage, notamment à basses températures, un précipité blanc peut se former dans les **tampons L1, L2 et L4**. On peut aisément dissoudre ces précipités en faisant incuber le flacon à **50-70 °C** avant l'emploi.

8.2 Préparation des échantillons

8.2.1 Préparation des échantillons pour PapillOCheck® et PapillOCheck® high-risk

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le kit de prélèvement Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 070)
- et le milieu de prélèvement **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, États-Unis)

peuvent être traités directement.

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le milieu de collecte **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) doivent être lavés avant l'emploi : centrifuger **250 µl** de l'échantillon pendant **5 minutes** à **11 000 g** et resuspendre le culot dans **250 µl** d'eau distillée.

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le milieu de collecte **STM™** (Qiagen, Hilden, Allemagne) doivent être dilués dans de l'eau distillée : **100 µl** d'échantillon + **150 µl** d'eau distillée.

!

En général, si l'échantillon du frottis du col de l'utérus est très concentré et déjà agrégé, il doit être dilué et homogénéisé avant le début de l'extraction !

Les échantillons de frottis du col de l'utérus qui sont très dilués et qui ne présentent pas de cellule visible doivent être concentrés pour obtenir une plus forte concentration de cellules en vue de l'extraction. Centrifuger jusqu'à **1000 µl** d'échantillon pendant **5 minutes** à **11 000 g** et resuspendre le culot dans **250 µl** d'eau distillée.

Cette étape de concentration ne s'applique que pour les échantillons de frottis du col de l'utérus qui ont été recueillis à l'aide du kit de collecte Papill**oCheck**®, du milieu de collecte **PreservCyt**® ou du milieu de collecte **Surepath™**. Si le milieu de collecte **STM™** a été utilisé, une concentration par centrifugation n'est pas possible.

➠ Pipeter **250 µl** de solution échantillon dans un microtube de 1,5 ou 2 ml. Pour éviter toute contamination, utiliser des tubes de réaction avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse. Il est recommandé de valider toute la procédure d'isolation d'ADN de chaque cycle d'extraction d'ADN à l'aide d'un **contrôle négatif d'échantillon**.

8.2.2 Préparation des échantillons pour PelvOCheck® CT/NG

Les échantillons d'urine humaine qui sont recueillis avec :
- le kit de prélèvement Pelv**oCheck**® SAFE (Greiner Bio-One ; réf. 453 100)
- le kit de prélèvement Pelv**oCheck**® STRAW (Greiner Bio-One ; réf. 453 101)

peuvent être traités directement.

➠ Pipeter **250 µl** de l'échantillon d'urine dans un microtube de 1,5 ou 2 ml. Il est recommandé d'utiliser des microtubes avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse. Pour valider l'extraction d'ADN, il faut utiliser un **contrôle négatif d'échantillon** pour chaque cycle d'extraction.

8.3 Protocole standard

8.3.1 Préparation

- Vérifier que la centrifugeuse est réglée sur la **température ambiante (de 18 à 25 °C)**.
- Préparer les échantillons conformément au chapitre 8.2.
- Régler les blocs chauffants ou les bains-marie respectivement sur **56 °C** et **70 °C**.
- Avant élution, incuber le **tampon E** d'élution à **70 °C**.
- S'assurer que les solutions ont été préparées conformément au chapitre 8.1.

8.3.2 Pré-lyse

- Ajouter **80 µl** de **tampon L1**.
- Ajouter **2,4 µl** de la solution **d'ARN porteur** préparée.
- Ajouter **20 µl** de solution de **protéinase K**.
- Fermer le bouchon et mélanger brièvement à l'aide d'un vortex.
- Incuber à **56 ºC** pendant au moins **30 minutes**. Agiter les échantillons à l'aide d'un thermomixer à **650 rpm**. Lors de l'utilisation d'un bloc chauffant ou d'un bain-marie, agiter de temps en temps les échantillons à l'aide d'un vortex.

! En cas de traitement de plusieurs échantillons, **la protéinase K, le tampon L1 et l'ARN porteur** doivent être prémélangés directement avant l'emploi. Ne jamais mélanger le **tampon L1** et la **protéinase K** plus de **10 à 15 minutes** avant de les ajouter à l'échantillon. La **protéinase K** s'auto-digère dans le **tampon L1** sans substrat.

8.3.3 Lyse

- Centrifuger brièvement le microtube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.
- Ajouter **250 µl** de **tampon L4**.
- Fermer le bouchon et mélanger à l'aide d'un vortex pendant **10 secondes**.
- Incuber à **70 ºC** pendant **15 minutes**.

! Fermer hermétiquement le bouchon des microtubes afin d'éviter une ouverture accidentelle des bouchons.

8.3.4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

- Centrifuger brièvement le microube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.
- Ajouter **300 µl d'éthanol** (p.a. ≥ 99,8 %) à l'échantillon.
- Fermer immédiatement le bouchon et mélanger à l'aide d'un vortex pendant **15 secondes**.
- Centrifuger brièvement le microtube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.

8.3.5 Fixation de l'ADN

Afin d'éviter toute contamination : mettre de nouveaux gants avant cette étape !

- Pour chaque échantillon, mettre une **colonne** dans un **tube collecteur**.
- Pipeter soigneusement **450 µl** des **lysats** dans la **colonne** et centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute** à **température ambiante**. Ne pas jeter le reste du lysat !
- Jeter le **tube collecteur** avec le surnageant.

Afin d'éviter toute contamination : mettre de nouveaux gants avant cette étape !

- Préparer de nouveaux **tubes collecteurs** et mettre les **colonnes** dans de nouveaux **tubes collecteurs**.
- Pipeter le reste des **450 µl de lysat** dans la **colonne**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute** à **température ambiante**.

Afin d'éviter toute contamination : mettre de nouveaux gants avant cette étape !

- Jeter le **tube collecteur** avec le surnageant et mettre les **colonnes** dans de nouveaux **tubes collecteurs**.

8.3.6 Lavage des colonnes

- Appliquer **500 µl** de **tampon W1** dans la **colonne**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute** à **température ambiante**.
- Jeter le **tube collecteur** avec le surnageant et remettre la **colonne** dans un nouveau **tube collecteur**.
- Appliquer **600 µl** de **tampon W2** dans la **colonne**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute** à **température ambiante**.
- Jeter le **tube collecteur** avec le surnageant et remettre la **colonne** dans un nouveau **tube collecteur**.

8.3.7 Séchage des colonnes

- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute** pour sécher complètement la membrane.

! Cette étape est nécessaire pour éliminer toute trace d'éthanol. L'éthanol contenu dans le **tampon W2** inhibe les réactions enzymatiques et doit être complètement éliminé avant l'élution de l'ADN.

8.3.8 Élution de l'ADN

Utiliser le **tampon E** préchauffé **(70 °C)** !

Pour éviter une baisse de la température pendant les étapes de pipetage, nous recommandons de remplir les microtubes de 1,5 ou 2,0 ml avec un maximum de **1 300 µl de tampon E** (cela suffit pour n = 12 échantillons).

Afin d'éviter toute contamination : mettre de nouveaux gants avant cette étape !

- Placer la **colonne** dans un microtube de 1,5 ml propre.
- Appliquer **100 µl** de **tampon E** préchauffé **(70 °C)** au centre de la membrane, dans la **colonne**.
- Fermer le bouchon et incuber à température ambiante pendant **1 minute**.
- Centrifuger à **11 000 g** pendant **1 minute**.

Pour une performance optimale de l'ADN isolé dans les applications en aval, nous recommandons une élution avec le **tampon E** fourni. Stocker l'ADN extrait à **-20 °C**.
Pour une analyse supplémentaire avec les systèmes d'essai de la gamme de produits oCheck® , consulter les instructions d'utilisation respectives (Papill**oCheck**®, Papill**oCheck**® high-risk et Pelv**oCheck**® CT/NG).

9. GUIDE D'INSTALLATION ET DE TRAVAIL POUR oCheck® VAC SET ET oCheck® VAC PUMP

La **chambre à vide** oCheck® est conçue pour une purification manuelle en parallèle rapide des acides nucléiques à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation en barrettes de 8 colonnes. Ce système permet une purification rapide simultanée d'acides nucléiques de haute qualité. Les étapes de centrifugation sont éliminées grâce à l'utilisation du vide. Les kits d'extraction d'ADN oCheck® reposent sure le principe d'une technologie d'ultra-filtration et offrent une méthode rapide et pratique pour la purification des acides nucléiques.

Lors de l'utilisation du kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation en barrette de 8 colonnes sous vide, il est recommandé d'utiliser oCheck® VacSet (réf. 863 080) et oCheck® VacPump (réf. 863 070).

9.1 Composants

9.1.1 oCheck® VacSet

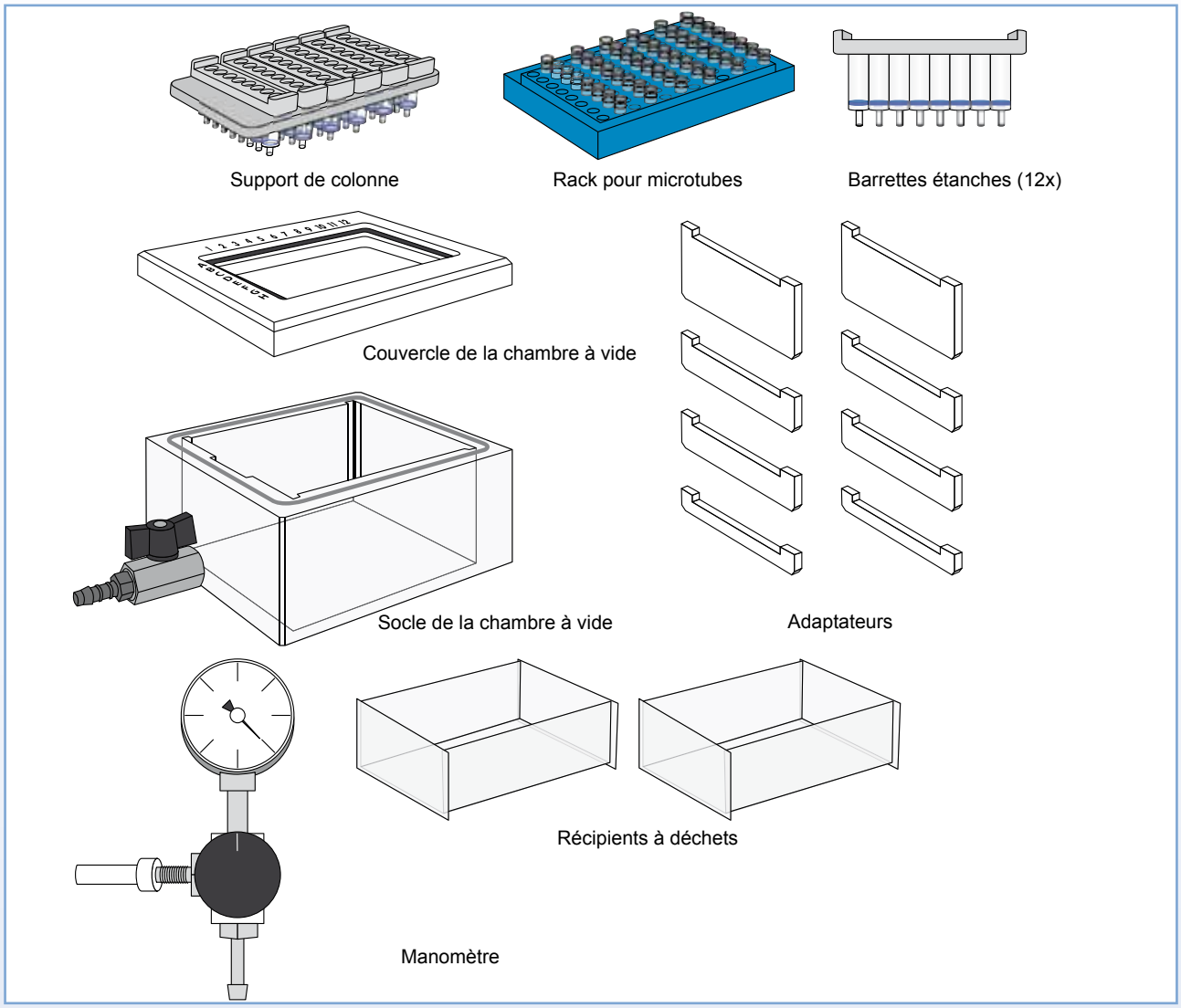


Figure 2 : Composants de oCheck® VacSet

9.1.2 oCheck® VacPump

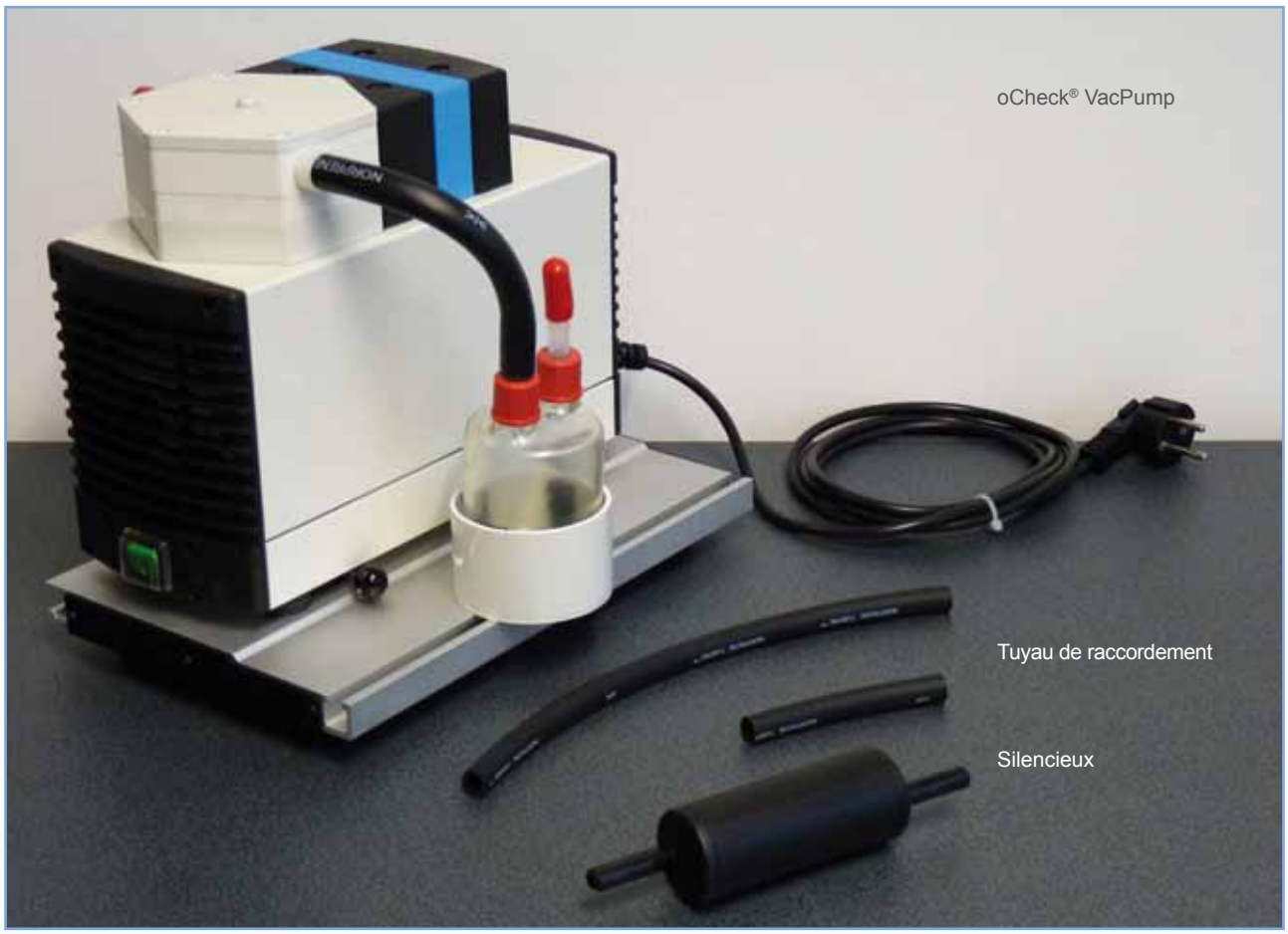


Figure 3 : Composants de oCheck® VacPump

9.2 Montage du oCheck® VacSet

- Placer le **socle de la chambre à vide** sur une paillasse stable. La **chambre à vide** doit être préparée de la manière représentée sur **la figure 4 a et la figure b**.

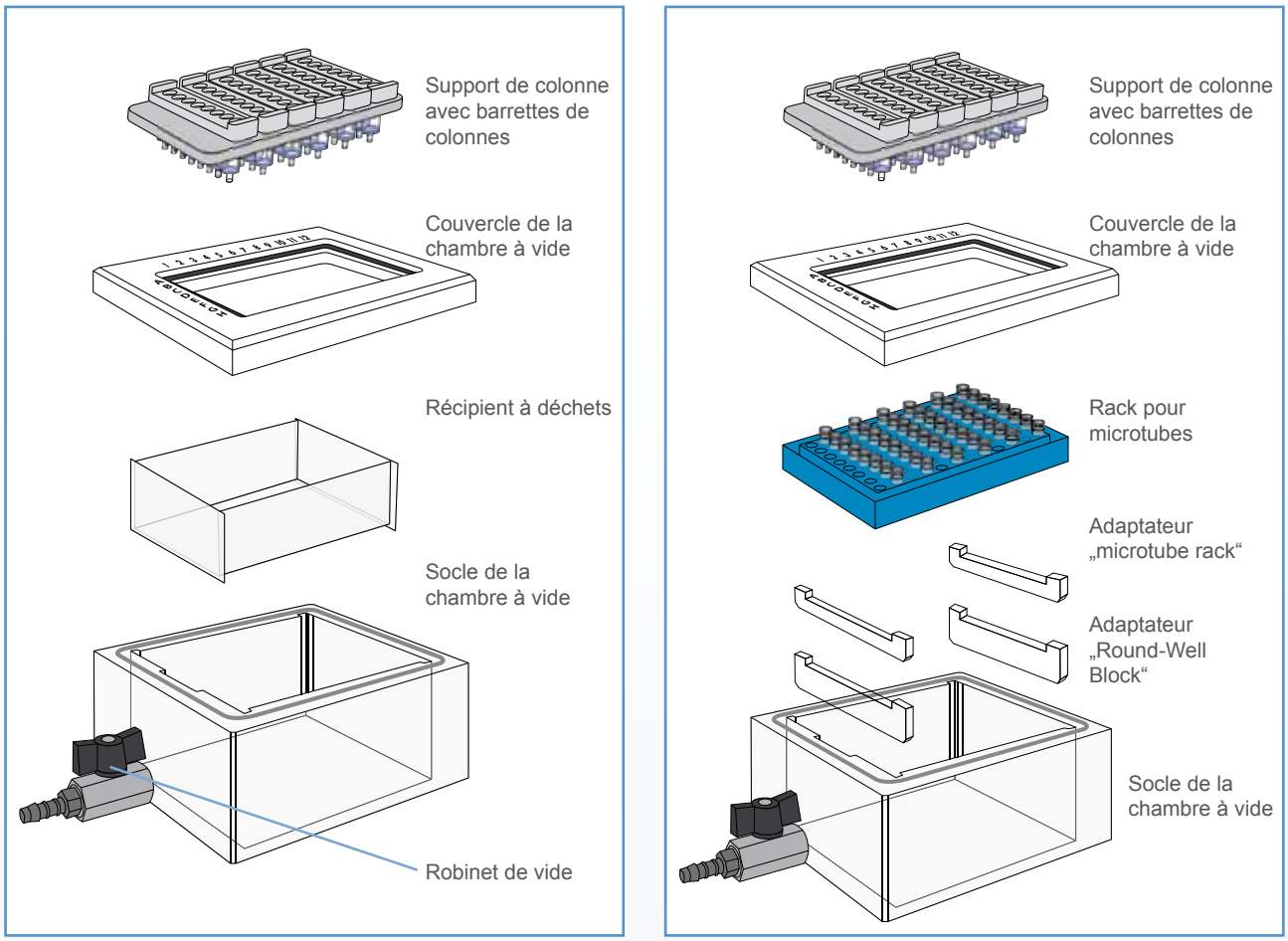

Support de colonne avec barrettes de colonnes
Couvercle de la chambre à vide
Récipient à déchets
Socle de la chambre à vide
Robinet de vide
Support de colonne avec barrettes de colonnes
Couvercle de la chambre à vide
Rack pour microtubes
Adaptateur „microtube rack“
Adaptateur „Round-Well Block“
Socle de la chambre à vide

Figure 4 : a) Installation pour la fixation et le lavage de l'ADN **b)** Installation pour l'élution de l'ADN

9.2.1 Installation pour la fixation et le lavage de l'ADN

- Pour les procédures de fixation et de lavage de l'ADN (étapes 10.3.5 et 10.3.7 du protocole), installer la **chambre à vide** de la manière représentée sur la figure 4a.
- Placer l'un des deux **récipients à déchets*** dans le **socle de la chambre à vide**.
- Fermer le **socle de la chambre à vide** à l'aide du **couvercle de la chambre à vide**.
- Placer le **support de colonne** dans le joint d'étanchéité en caoutchouc du **couvercle de la chambre à vide**.
- Insérer la quantité requise de **barrettes de colonnes** dans le **support de colonne**.
- S'assurer que les **barrettes de colonnes** sont correctement insérées et que les **barrettes de colonnes** ferment hermétiquement le **support de colonne** (c'est le cas lorsqu'un « clic » se fait entendre). Si moins de 48 échantillons sont traités à la fois, n'insérer que la quantité requise de **barrettes de colonnes** dans le support et remplir les espaces restants du **support de colonne** avec la quantité appropriée de **barrettes étanches**.

!

S'assurer que les **barrettes de colonnes** et **barrettes étanches** s'adaptent correctement dans le **support de colonne** avant d'appliquer le vide.
* Ne pas mettre le **récipient à déchets** au lave-vaisselle pour le laver !

9.2.2 Installation pour l'élution de l'ADN

Pour les étapes d'élution de l'ADN (étape 10.3.8 du protocole), la **chambre à vide** doit être configurée selon la **figure 4b**.

- Retirer le **support de colonne** avec les **barrettes de colonnes** et le placer sur une **feuille de papier** propre (fournie avec le kit).
- Retirer le couvercle de la **chambre à vide** et retirer le **récipient à déchets usagé**.
- Insérer les **adaptateurs « Round-Well Block »** surmontés des adaptateurs de **«microtube rack»** dans le socle de la **chambre à vide** (**figure 4b**).
- Placer le **rack pour microtubes** sur les **adaptateurs**.
- Placer la quantité appropriée de tubes PCR repérés ou numérotés dans une rangée sur deux dans le **rack pour microtubes** en commençant par la deuxième rangée.
- Fermer la **chambre à vide** et placer les **barrettes de colonnes** sur le dessus. Vérifier que les **barrettes de colonnes** se trouvent directement au-dessus d'un microtube PCR pour recueillir l'ADN élué (**figure 4c**). Revérifier que toutes les **barrettes de colonnes** et **barrettes étanches** sont toujours correctement ajustées dans le **support de colonne**.

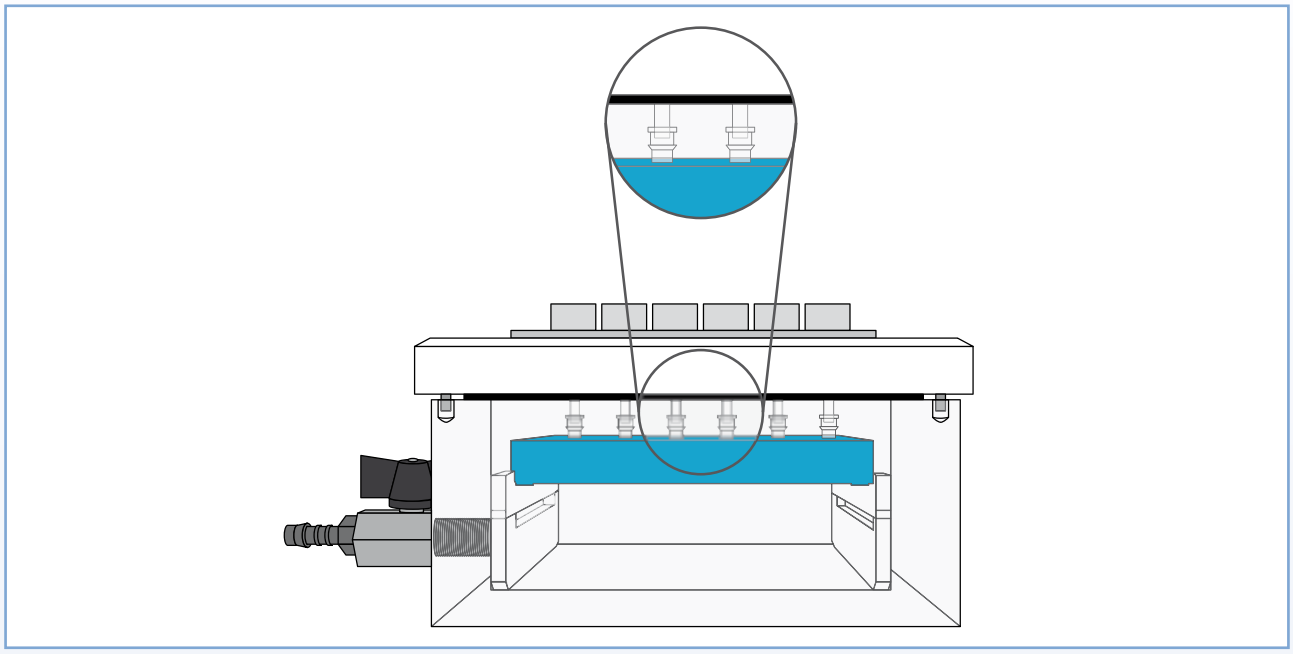


Figure 4c : Chaque colonne de barrettes de colonnes doit être située directement au-dessus d'un tube PCR de la barrette PCR.

9.3 Montage de oCheck® VacPump

Placer le oCheck® VacPump sur une paillasse stable. Le kit oCheck® VacPump doit être assemblé selon la figure 5a. Pour relier l'oCheck® VacPump à la **chambre à vide,** utiliser le plus long tube des deux **tubes de connexion** joints. Couper le plus court des **tubes de connexion** en deux parties (d'environ 5 et 4 cm). Utiliser le **tube de connexion** de 5 cm pour relier l'oCheck VacPump au **manomètre**. Fixer le **silencieux** sur le côté opposé de l'oCheck® VacPump à la sortie à l'aide du **tube de connexion** de 4 cm.

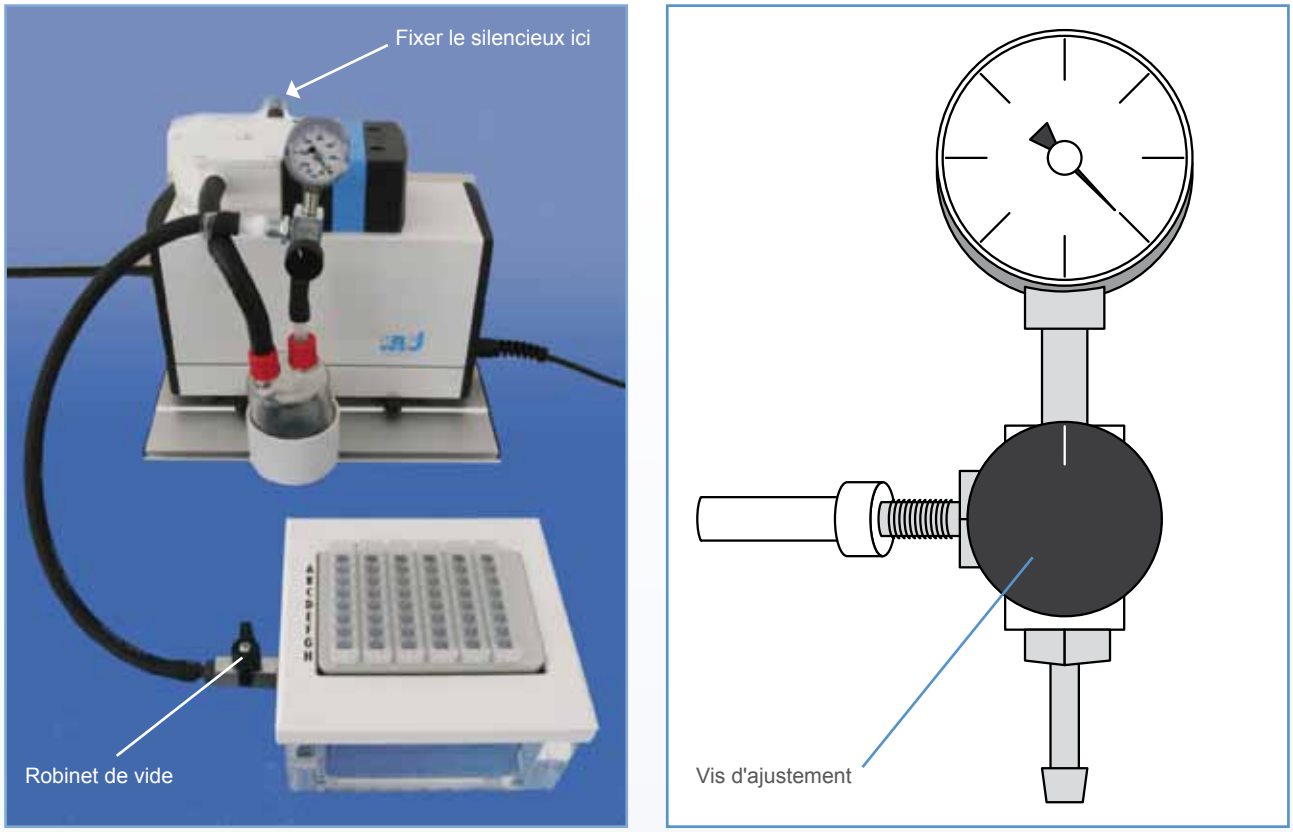


Figure 5 : a) Montage du oCheck® VacPump **b)** manomètre

9.4 Etablissement du vide

S'assurer que le couvercle de la **chambre à vide**, le **support de colonne** et les **barrettes de colonnes** sont correctement placés. Fermer le **robinet de vide** (**figure 5a**). Démarrer la **pompe à vide**. Ajuster le vide conformément au protocole du kit, à l'aide du **manomètre** (**figure 5b**). Ouvrir la **vis d'ajustement** jusqu'à ce que le vide requis soit atteint.

9.5 Application du vide

Charger les échantillons dans les **barrettes de colonnes** individuelles. Ouvrir le **robinet de vide** et, si nécessaire, enfoncer les **barrettes de colonnes** individuelles brièvement jusqu'à ce que l'écoulement démarre.

9.6 Arrêt du vide

Lorsque les échantillons ont traversé le filtre des **barrettes de colonnes,** fermer le **robinet de vide** et arrêter la **pompe à vide**. Attendre environ 30 secondes jusqu'à ce que le **support de colonne** avec les **barrettes de colonnes** puisse être facilement retiré.

10. PRÉPARATION EN BARRETTES DE 8 COLONNES (réf. 515 050)

10.1 Préparation des solutions et conditions de conservation

Tous les composants du kit doivent être conservés à **température ambiante (de 18 à 25 °C).** Ils restent stables pendant **deux ans** à compter de la date de fabrication.

Avant de commencer à suivre le protocole du kit d'extraction d'ADN oCheck®, préparer les solutions suivantes :

1. Solution de **protéinase K :** avant d'utiliser le kit pour la première fois, ajouter **3,35 ml** de **tampon de protéinase (PKB)** pour dissoudre la **protéinase K** lyophilisée. Repartir la solution en aliquots et conserver à -20 °C pendant une durée maximale de 6 mois. Ne pas recongeler.

2. **Tampon W2 :** ajouter **200 ml** d'**éthanol** (p.a. ≥ 99,8 %) au concentré de **tampon W2**. Écrire la date sur l'étiquette du flacon. Le **tampon W2** reste stable à **température ambiante (de 18 à 25 °C)** jusqu'à **un an**.

3. **Tampon L4 :** transférer l'intégralité du **tampon L2** dans le **réactif L3** et bien mélanger. Étiqueter le flacon à l'aide de l'étiquette **L4** fournie dans le kit. Écrire la date sur l'étiquette du flacon. Le **tampon L4** résultant reste stable jusqu'à **un an** à **température ambiante (de 18 à 25 °C)**.

4. Solution d'**ARN porteur :** ajouter **900 µl** de **tampon L1** pour dissoudre l'**ARN porteur lyophilisé**. Distribuer l'**ARN porteur** lyophilisé en aliquots, par exemple en aliquots de **50 µl** pour 16 extractions. Stocker la solution d'ARN porteur dissoute à **-20° C**. Ne pas recongeler ! Les flacons utilisés doivent être éliminés une fois décongelés.

Pendant le stockage, notamment à basses températures, un précipité blanc peut se former dans les **tampons L1, L2 et L4**. On peut aisément dissoudre ces précipités en faisant incuber le flacon à **50-70 °C** avant l'emploi.

10.2 Préparation des échantillons

10.2.1 Préparation des échantillons pour les kits de prélèvement Papill**oCheck**® et Papill**oCheck**® **high-risk**

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le kit de prélèvement Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 070)
- et le milieu de prélèvement **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, États-Unis)

peuvent être traités directement.

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le milieu de prélèvement **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) doivent être lavés avant l'emploi : centrifuger **250 µl** de l'échantillon pendant **5 minutes** à **11 000 g** et resuspendre le culot dans **250 µl** d'eau distillée.

Les frottis du col de l'utérus qui sont recueillis avec
- le milieu de prélèvement **STM™** (Qiagen, Hilden, Allemagne) doivent être dilués dans de l'eau distillée : **100 µl** d'échantillon + **150 µl** d'eau distillée.

!

En général, si l'échantillon du frottis du col de l'utérus est très concentré et déjà agrégé, il doit être dilué et homogénéisé avant le début de l'extraction !

Les échantillons de frottis du col de l'utérus qui sont très dilués et qui ne présentent pas de cellule visible doivent être concentrés pour obtenir une plus forte concentration de cellules en vue de l'extraction. Centrifuger jusqu'à **1000 µl** d'échantillon pendant **5 minutes** à **11 000 g** et resuspendre le culot dans **250 µl** d'eau distillée.
Cette étape de concentration ne s'applique que pour les échantillons de frottis du col de l'utérus qui ont été recueillis à l'aide du kit de collecte Papill**oCheck**®, du milieu de prélèvement **PreservCyt**® ou du milieu de prélèvement **Surepath™.** Si le milieu de collecte **STM™** a été utilisé, une concentration par centrifugation n'est pas possible.

➠ Pipeter 250 µl de solution échantillon dans un microtube d'1,5 ou 2 ml. Pour éviter toute contamination, utiliser des microtubes avec fermeture sécurisée ou fermeture à vis pour les étapes de lyse.

Il est recommandé de valider toute la procédure d'isolation d'ADN de chaque cycle d'extraction d'ADN à l'aide d'un contrôle négatif d'échantillon.

10.3 Protocole standard

Lors de l'utilisation du kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation en barrette de 8 colonnes - sous vide, un système de vide approprié est nécessaire. L'équipement nécessaire, ainsi que l'installation et les instructions de travail, sont décrits dans le chapitre 9.

10.3.1 Préparation

- Vérifier que la centrifugeuse est réglée sur la **température ambiante (de 18 à 25 °C)**.
- Préparer les échantillons conformément au chapitre 10.2.
- Régler les blocs chauffants ou les bains-marie sur **56 °C** et **70 °C**, respectivement.
- Avant élution, incuber le **tampon E** d'élution fourni à **70 °C**.
- S'assurer que les solutions de travail ont été préparées conformément au chapitre 10.1.

10.3.2 Pré-lyse

- Ajouter **80 µl** de **tampon L1**.
- Ajouter **2,4 µl** de la solution **ARN porteur** préparée.
- Ajouter **20 µl** de solution de **protéinase K**.
- Fermer le bouchon et mélanger brièvement à l'aide d'un vortex.

! En cas de traitement de plusieurs échantillons, la **protéinase K**, le **tampon L1** et **l'ARN porteur** doivent être prémélangés directement avant l'emploi. Ne jamais mélanger **le tampon L1** et la **protéinase K** plus de 10 à 15 minutes avant de les ajouter à l'échantillon. La **protéinase K** a tendance à s'auto-digérer dans le **tampon L1** sans substrat.

- Incuber à **56 ºC** pendant au moins **30 minutes**. Agiter les échantillons à l'aide d'un thermomixer à **650 rpm**. Lors de l'utilisation d'un bloc chauffant ou d'un bain-marie, agiter de temps à autre les échantillons à l'aide d'un vortex tout au long de la période d'incubation.

10.3.3 Lyse

- Centrifuger brièvement le microtube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.
- Ajouter **250 µl** de **tampon L4**.
- Fermer le bouchon et mélanger à l'aide d'un vortex pendant **10 secondes**.
- Incuber à **70 ºC** pendant **15 minutes**.
- Fermer hermétiquement le bouchon des microtubes afin d'éviter une ouverture accidentelle des bouchons.

10.3.4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

- Centrifuger brièvement le microtube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.
- Ajouter **300 µl** d'**éthanol** (p.a. ≥ 99,8 %) à l'échantillon.
- Fermer immédiatement le bouchon et mélanger à l'aide d'un vortex pendant **15 secondes**.
- Centrifuger brièvement le microtube afin d'éliminer les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du bouchon.

10.3.5 Fixation de l'ADN

- Préparer la **chambre à vide** oCheck® conformément à **la figure 6** (consulter le chapitre 9 pour une description plus détaillée).

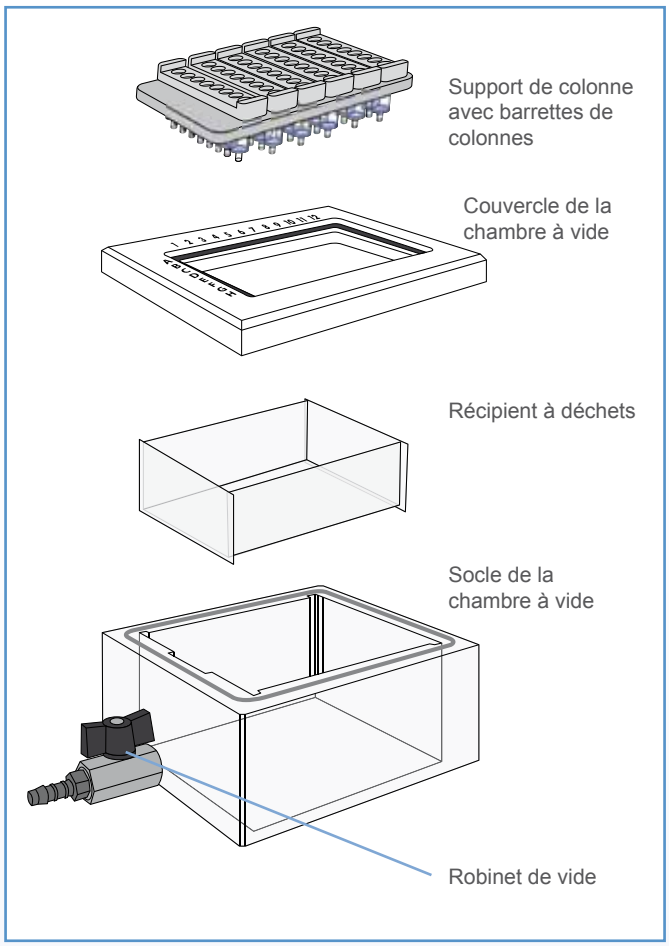

Support de colonne avec barrettes de colonnes
Couvercle de la chambre à vide
Récipient à déchets
Socle de la chambre à vide
Robinet de vide

Figure 6 : Installation pour la fixation et le lavage de l'ADN

- Placer l'un des deux **récipients à déchets*** dans le **socle de la chambre à vide**.
- Fermer le **socle de la chambre à vide** avec le **couvercle de la chambre à vide**.
- Placer le **support de colonne** dans le joint d'étanchéité en caoutchouc du **couvercle de la chambre à vide**.
- Insérer la quantité requise de **barrettes de colonnes** dans le **support de colonne**. S'assurer que les **barrettes de colonnes** sont correctement insérées et que les **barrettes de colonnes** ferment hermétiquement le **support de colonne** (c'est le cas lorsqu'un « clic » se fait entendre). Si moins de 48 échantillons sont traités à la fois, n'insérer que la quantité requise de **barrettes de colonnes** dans le support et remplir les espaces restants du **support de colonne** avec la quantité appropriée de **barrettes étanches**.

!

S'assurer que les **barrettes de colonnes** et **barrettes étanches** s'adaptent correctement dans le **support de colonne** avant d'appliquer le vide.

* Ne pas mettre le **récipient à déchets** au lave-vaisselle pour le laver !

- Pipeter soigneusement **900 µl** des lysats dans les puits des **barrettes de colonnes** et veiller à ne pas toucher les bords des puits (**figure 7**).

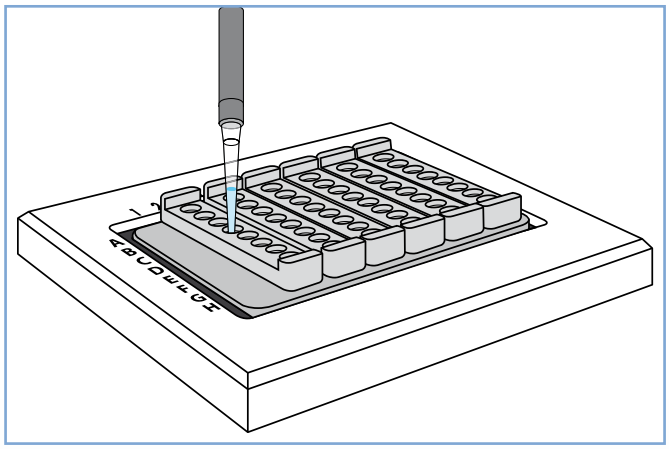
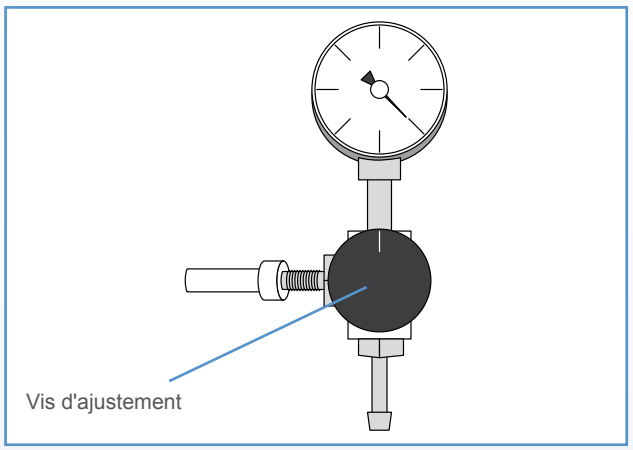


Figure 7 : Pipetage du lysat dans les puits des barrettes de colonnes

- Régler le vide sur **-200 mbar** à l'aide du manomètre (**figure 8a**).
- Appliquer doucement le vide en ouvrant le **robinet de vide** jusqu'à ce que les lysats soient passés à travers les colonnes (**figure 8b**).



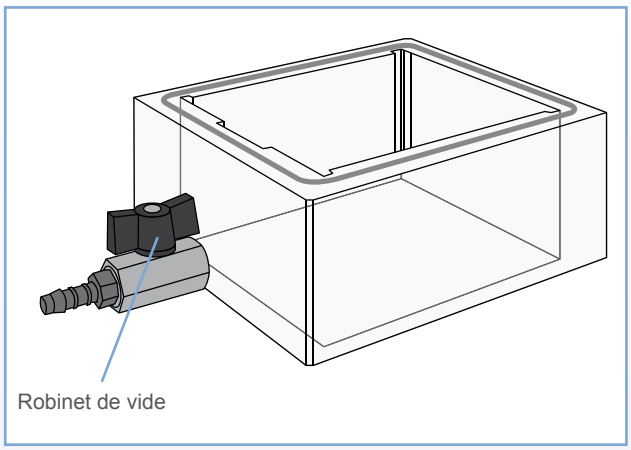


Figure 8 : a) manomètre **b)** robinet de vide

- Arrêter le vide dès que tout le liquide est passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**) afin d'éviter la formation de mousse lors de la fermeture du **robinet de vide**.
- Éteindre la **pompe à vide** et libérer le vide.

10.3.6 Lavage des barrettes de colonnes

Pour les étapes suivantes, l'utilisation de la micropipette à 8 canaux et des réservoirs pour réactifs est recommandée (pour les volumes de tampon requis en cas d'utilisation des réservoirs pour réactifs, voir le **tableau 1**).
En cas d'utilisation des réservoirs pour tampons, préparer la quantité appropriée de solutions tampons.

Nombre d'échantillons à extraire	8	16	24	32	40	48
Tampon W1	6,5 ml	12 ml	17,5 ml	23 ml	28,5 ml	34 ml
Tampon W2*	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml	96 ml

Tableau 1 : Quantité requise de solutions tampons pour n = x échantillons

* Avant la première utilisation, ajouter 200 ml d'éthanol (voir également le chapitre 10.1).

- Ajouter **600 µl** de **tampon W1** à chaque puits des **barrettes de colonnes** (**figure 9 a+b**).

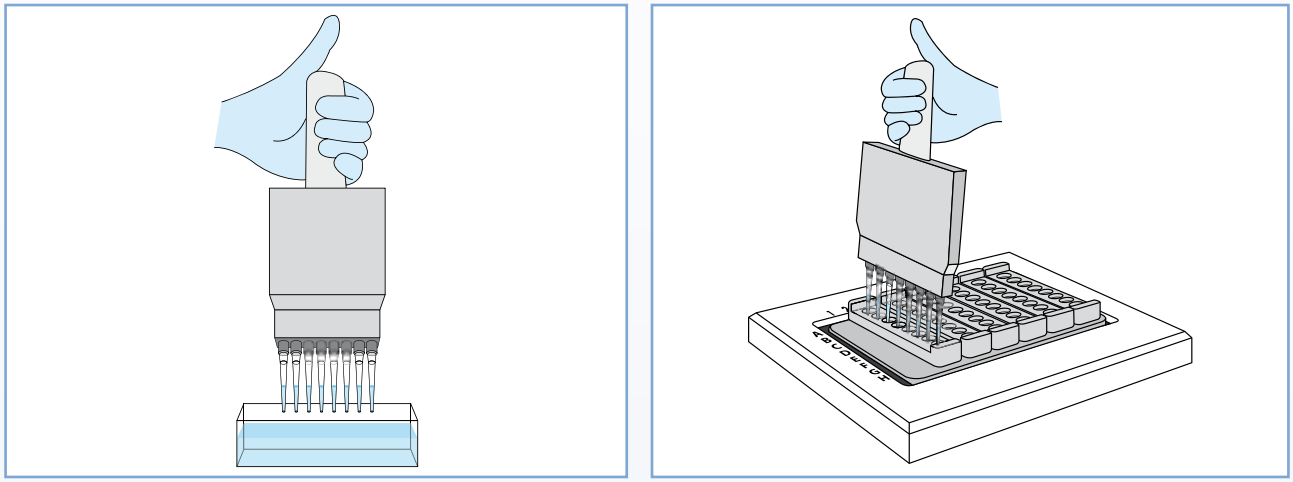


Figure 9 : a) Pipetage du tampon W1 dans le réservoir pour tampons. **b)** Ajout du tampon W1 aux puits des barrettes de colonnes.

- Régler le vide sur **-200 mbar** avec le **manomètre**.
- Appliquer doucement le vide en ouvrant le **robinet de vide** jusqu'à ce que les lysats soient passés à travers les colonnes (**figure 8**).
- Arrêter le vide directement en fermant le **robinet de vide** une fois que tout le liquide est passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**) pour éviter la formation de mousse.
- Ajouter **900 µl** de **tampon W2** à chaque puits des **barrettes de colonnes**.
- Régler le vide sur **-200 mbar** avec le **manomètre**.
- Appliquer le vide jusqu'à ce que le tampon soit passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**).
- Arrêter le vide directement en fermant le **robinet de vide** une fois que tout le liquide est passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**) pour éviter la formation de mousse.
- Ajouter **900 µl** de **tampon W2** à chaque puits des **barrettes de colonnes**.
- Régler le vide sur **-200 mbar** avec le **manomètre**.
- Appliquer le vide jusqu'à ce que tout le tampon soit passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**).
- Arrêter le vide directement en fermant le **robinet de vide** une fois que tout le liquide est passé à travers les colonnes (environ **30 secondes**) pour éviter la formation de mousse.
- Éteindre la **pompe à vide** et libérer le vide.

10.3.7 Séchage des barrettes de colonnes

- Après l'étape finale de lavage, arrêter le vide (section 9.6). Retirer le **support de colonne** avec les **barrettes de colonnes**. Pendant ce temps, retirer le **couvercle de la chambre à vide** et retirer le **récipient à déchets** usagé et le remplacer par le récipient à déchets inutilisé (propre).
- Insérer le **couvercle de la chambre à vide** avec le **support de colonne** et les **barrettes de colonnes** dans le **socle de la chambre à vide**. S'assurer que la **chambre à vide** est à nouveau hermétiquement fermée et que toutes les **barrettes de colonnes** ou **barrettes étanches** sont correctement ajustées.
- Appliquer le vide maximal (au moins **~400 à ~600 mbar** de différence de pression) pendant **10 minutes** pour sécher complètement la membrane.
- Éteindre la **pompe à vide** et libérer le vide.

! Cette étape est nécessaire pour éliminer toute trace d'éthanol. L'éthanol contenu dans le **tampon W2** inhibe les réactions enzymatiques et doit être complètement éliminé avant l'élution de l'ADN.

10.3.8 Élution de l'ADN

Pour les étapes d'élution suivantes, la **chambre à vide** doit être modifiée conformément à la **figure 10**.

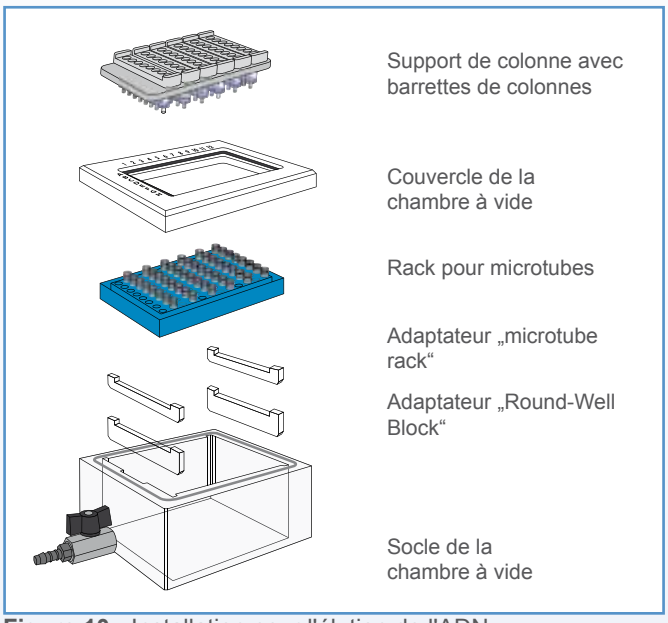

Support de colonne avec barrettes de colonnes
Couvercle de la chambre à vide
Rack pour microtubes
Adaptateur „microtube rack“
Adaptateur „Round-Well Block“
Socle de la chambre à vide

Figure 10 : Installation pour l'élution de l'ADN

- Retirer le **support de colonne** avec les **barrettes de colonnes** et le placer sur une **feuille de papier** propre (fournie avec le kit).
- Retirer le **couvercle de la chambre à vide** et retirer le **récipient à déchets** usagé.
- Insérer les **adaptateurs « Round-Well Block »** surmontés des adaptateurs de **«microtube rack»** dans le socle de la **chambre à vide** (**figure 10**).
- Placer le **rack pour microtubes** sur les **adaptateurs**.
- Placer la quantité appropriée de tubes PCR repérés ou numérotés dans une rangée sur deux du **rack pour microtubes** en commençant par la deuxième rangée du **rack pour microtubes**.
- Fermer la **chambre à vide** et placer les **barrettes de colonnes** sur le dessus. Vérifier que les **barrettes de colonnes** se trouvent directement au-dessus d'un microtube PCR pour recueillir l'ADN élué (**figure 11**). Revérifier que toutes les **barrettes de colonnes** et **barrettes étanches** sont toujours correctement ajustées dans le **support de colonne**.

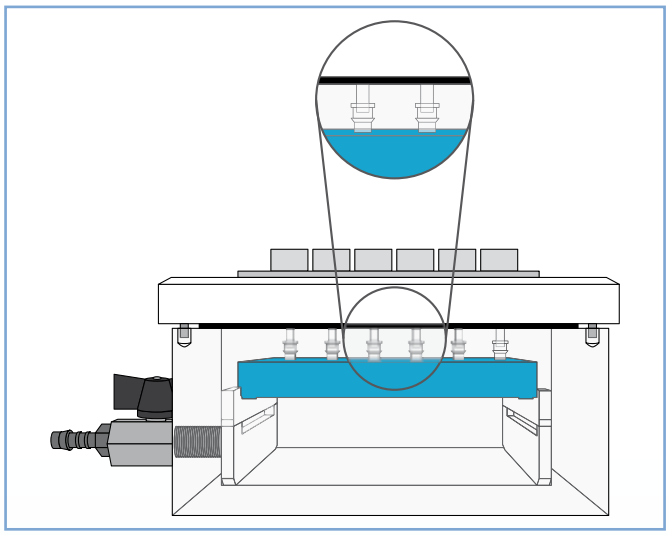


Figure 11 : Chaque colonne de barrettes de colonnes doit être située directement au-dessus d'un tube PCR de la barrette PCR.

- Pipeter **100 µl** de tampon E préchauffé (**70 ºC**) directement sur la membrane de chaque **barrette de colonne** à l'aide d'une pipette mono-canal. **Utiliser de nouvelles pointes pour chaque échantillon.**
- Incuber pendant **5 minutes** à **température ambiante**.
- Appliquer doucement le vide à un maximum de **-400 mbar** en ouvrant le **robinet de vide**.
- Arrêter rapidement le vide en fermant le **robinet de vide** directement après que tout le liquide est passé par les colonnes, afin d'éviter la formation de mousse.
- Éteindre la **pompe à vide** et libérer le vide.
- Fermer les microtubes PCR repérés ou numérotés pour les stocker.

!

Pour une performance optimale de l'ADN isolé, nous recommandons une élution avec le **tampon E** fourni. Stocker l'ADN extrait à **-20 ºC**.
Pour une analyse supplémentaire avec les systèmes d'essai de la gamme de produits oCheck® , consulter les instructions d'utilisation respectives (Papill**oCheck**® et Papill**oCheck**® high-risk).

11. DÉPANNAGE

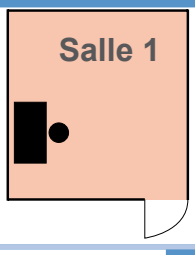
Problème et raison	Commentaires et suggestions
AUCUNE PRODUCTION D'ADN OU FAIBLE PRODUCTION D'ADN	
Lyse incomplète	• Échantillon non soigneusement homogénéisé et mélangé avec le tampon L1 / la protéinase K. Le mélange doit être vigoureusement mélangé avec un vortex immédiatement après l'ajout de tampon L1. • Nombre insuffisant de cellules dans l'échantillon. • Activité de la protéinase K diminuée : diviser la solution en aliquotes et conserver à -20 ºC pendant une durée maximale de 6 mois. Ne pas recongeler.
Réactifs non appliqués de manière appropriée	• Préparer les tampons L4 et W2, l'ARN porteur et la solution de protéinase K conformément à la section 8.1 ou 10.1. Ajouter de l'éthanol aux lysats avant de les charger sur les colonnes.
Élution sous-optimale de l'ADN depuis la colonne	• Préchauffer le tampon E à 70 °C avant élution. Appliquer le tampon E directement au centre de la membrane de silice. • L'efficacité de l'élution diminue considérablement si celle-ci est réalisée avec des tampons dont le pH est < 7.0. Utiliser des tampons d'élution légèrement alcalins tels que le tampon E (pH 8,5).
COLONNES BOUCHÉES	
Lyse incomplète	• Échantillon non soigneusement homogénéisé et mélangé avec le tampon L1 / la protéinase K. Le mélange doit être vigoureusement mélangé avec un vortex immédiatement après l'ajout de tampon L1. • Activité de la protéinase K diminuée : diviser la solution en aliquotes et conserver à –20 °C pendant une durée maximale de 6 mois. Ne pas recongeler.
Réactifs non appliqués de manière appropriée	• Préparer les tampons L4 et W2, l'ARN porteur et la solution de protéinase K conformément à la section 8.1 ou 10.1. Ajouter de l'éthanol aux lysats avant de les charger sur les colonnes.
PERFORMANCE SOUS-OPTIMALE DE L'ADN DANS LES RÉACTIONS ENZYMATIQUES	
Transfert d'éthanol ou de sel	• S'assurer de centrifuger au moins 1 minute à 11 000 g afin d'éliminer la totalité du tampon W2 à base d'éthanol avant l'élution de l'ADN. Si, pour quelque raison que ce soit, le niveau du tampon W2 a touché la sortie de la colonne après le séchage, répéter la centrifugation. • Ne pas refroidir le tampon W2 avant l'emploi. Un tampon froid n'élimine pas le sel de manière efficace. Équilibrer le tampon W2 à température ambiante avant l'emploi.
Contamination de l'ADN avec des substances inhibitrices	• Ne pas éluer l'ADN avec le tampon TE. L'EDTA peut inhiber les réactions enzymatiques. Repurifier l'ADN et l'éluer dans le tampon E. • Si le rapport A260/280 de l'éluat est inférieur à 1,6, répéter la procédure de purification : ajouter 1 volume de tampon L4 plus 1 volume d'éthanol (de 96 à 100 %) à l'éluat. Charger le mélange sur une colonne et procéder à l'étape de fixation de l'ADN (section 8.3.5 ou 10.3.5) du protocole standard.

12. ASSISTANCE TECHNIQUE

Greiner Bio-One possède un département de service technique dont le personnel est constitué de scientifiques expérimentés disposant d'un savoir-faire pratique et théorique approprié dans le domaine de la biologie moléculaire et des produits oCheck®.
En cas de questions ou de difficultés concernant les produits oCheck®, n'hésitez surtout pas à contacter Greiner Bio-One ou votre distributeur local.

13. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Le kit d'extraction d'ADN oCheck® est un accessoire de DIV destiné à être utilisé avec les réactifs de la gamme de produits oCheck®. Les performances analytiques et spécifiques du kit d'extraction d'ADN oCheck® ont été testées en association avec les réactifs correspondants. Veuillez consulter les instructions d'utilisation des produits oCheck® respectifs pour une description détaillée des performances [Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One ; réf. 465 060), Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One ; réf. 505 060) et Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One ; réf. 504 002)].



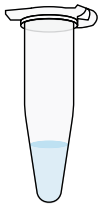
14. PROTOCOLES RÉSUMÉS

14.1 Protocole résumé pour la préparation en colonne unitaire (réf. 515 040)

Extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® - Préparation avec une colonne unitaire (Greiner Bio-One ; réf. 515 040)

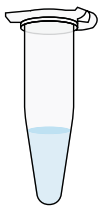
1. PRÉPARATION

- Vérifier que la centrifugeuse est réglée sur la température ambiante (18 à 25 °C)
- Préparer les solutions de travail conformément au chapitre 8.1
- Régler les blocs chauffants ou les bains-marie sur 56 °C et 70 °C
- Préchauffer le tampon E d'élution à 70 °C
- Préparer les échantillons conformément au chapitre 8.2.
- Pipeter 250 µl d'échantillon dans un microtube de 1,5 ou 2,0 ml



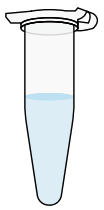
2. PRÉ-LYSE

- 80 µl de tampon L1
- 2,4 µl de solution d'ARN porteur
- 20 µl de solution de protéinase K
- Agiter brièvement avec un vortex !
- 56 °C pendant au moins 30 minutes
- Centrifuger brièvement!



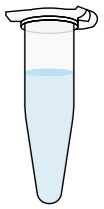
3. LYSE

- 250 µl de tampon L4
- Agiter brièvement avec un vortex !
- 70 °C pendant 15 minutes
- Centrifuger brièvement!



4. AJUSTEMENT DES CONDITIONS DE FIXATION DE L'ADN

- 300 µl d'éthanol
- Agiter brièvement avec un vortex!
- Centrifuger brièvement!



PROTOCOLE RÉSUMÉ

5. FIXATION DE L'ADN

- Préparer les colonnes
- 450 µl de lysat
- 1 minute à 11 000 g
- 450 µl de lysat
- 1 minute à 11 000 g

6. LAVAGE DES COLONNES

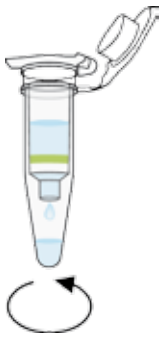
- 500 µl de tampon W1
- 1 minute à 11 000 g
- 600 µl de tampon W2
- 1 minute à 11 000 g

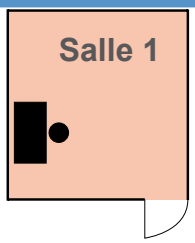
7. SÉCHAGE DES COLONNES

- Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 g

8. ÉLUTION DE L'ADN

- 100 µl de tampon E (préchauffé à 70 °C)
- 1 minute à température ambiante (de 18 à 25 °C)
- 1 minute à 11 000 g



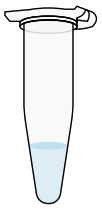


14.2 Protocole résumé pour la préparation en barrettes de 8 colonnes (réf. 515 050)

Extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® -
Préparation en barrettes de 8 colonnes (Greiner Bio-One ; réf. 515 050)

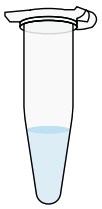
1. PRÉPARATION

- Vérifier que la centrifugeuse est réglée sur la température ambiante (18 à 25 °C)
- Préparer les solutions de travail conformément au chapitre 10.1
- Régler les blocs chauffants ou les bains-marie sur 56 °C et 70 °C
- Préchauffer le tampon E d'élution à 70 °C
- Préparer les échantillons conformément au chapitre 10.2.
- Pipeter 250 µl d'échantillon dans un tube de réaction d'1,5 ou 2,0 ml



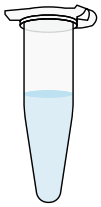
2. PRÉ-LYSE

- 80 µl de tampon L1
- 2,4 µl de solution d'ARN porteur
- 20 µl de solution de protéinase K
- Agiter brièvement avec un vortex !
- 56 °C pendant au moins 30 minutes
- Centrifuger brièvement!



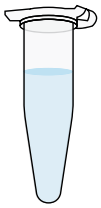
3. LYSE

- 250 µl de tampon L4
- Agiter brièvement avec un vortex !
- 70 °C pendant 15 minutes
- Centrifuger brièvement!



4. AJUSTEMENT DES CONDITIONS DE FIXATION DE L'ADN

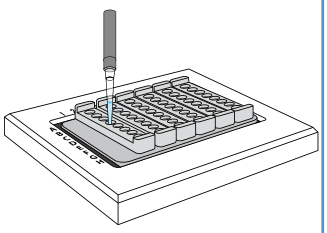
- 300 µl d'éthanol
- Agiter brièvement avec un vortex!
- Centrifuger brièvement!



PROTOCOLE RÉSUMÉ

5. FIXATION DE L'ADN

- Pipeter 900 µl de lysat sur les barrettes de colonnes
- Appliquer le vide : -200 mbar*
- Éviter la formation de mousse !

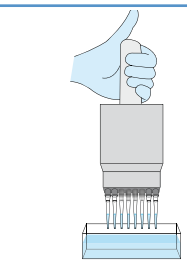


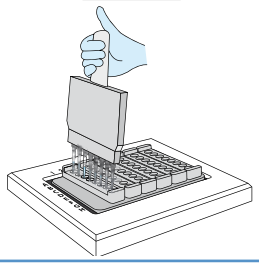
6. LAVAGE DES BARRETTES DE COLONNES

- 1er lavage avec 600 µl de tampon W1
- 2ème lavage avec 900 µl de tampon W2
- 3ème lavage avec 900 µl de tampon W2

Pour chaque étape de lavage :

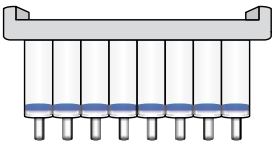
- 30 à 60 secondes
- -200 mbar*
- Éviter la formation de mousse !





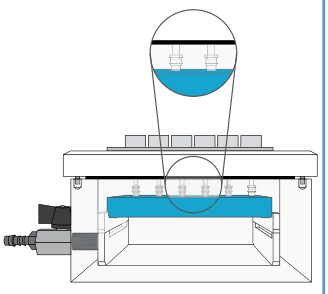
7. SÉCHAGE DES BARRETTES DE COLONNES

- 10 minutes à -600 mbar*



8. ÉLUTION DE L'ADN

- 100 µl de tampon E (préchauffé à 70 °C)
- 5 minutes à température ambiante (de 18 à 25 °C)
- Appliquer le vide : -400 mbar*
- Éviter la formation de mousse !



* Réduction de la pression atmosphérique : selon la viscosité de l'échantillon, il peut être nécessaire de prolonger le temps de filtration ou d'augmenter le vide (par exemple, de -200 à – 400 mbar).